

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer:

0 068 149

A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21)

Anmeldenummer: 82104606.7

(51)

Int. Cl.³: **A 61 L 15/04**, **A 61 L 15/03**,
A 61 L 17/00, **A 61 K 37/54**,
A 61 K 37/02

(22)

Anmeldetag: 25.05.82

(30)

Priorität: 25.06.81 DE 3124933
25.06.81 DE 3124962
12.08.81 DE 3131827
18.12.81 EP 81110615

(71)

Anmelder: Serapharm - Michael Stroetmann,
Kaiser-Wilhelm-Ring 38, D-4400 Münster (DE)

(43)

Veröffentlichungstag der Anmeldung: 05.01.83
Patentblatt 83/1

(72)

Erfinder: Stroetmann, Michael, Kaiser-Wilhelm-Ring 38,
D-4400 Münster (DE)

(24)

Benannte Vertragsstaaten: AT BE CH DE FR GB IT LI LU
NL SE

(74)

Vertreter: Brehm, Hans-Peter, Dr. Dipl.-Chem. et al,
Patentanwälte Tischer, Kern & Brehm
Albert-Rosshaupter-Strasse 65, D-8000 München 70 (DE)

(54)

Fibrinogen-haltiges Trockenpräparat, dessen Herstellung und Verwendung.

(57)

Ein Trockenpräparat mit einer durch Gefriertrocknung erzielten Schaum- bzw. Vliesstruktur besteht neben Thrombin in zumindest katalytisch wirksamen Mengen im wesentlichen aus etwa 10 bis 95 Gew.-% Fibrin und etwa 5 bis 90 Gew.-% Fibrinogen. Zur Herstellung wird in einer Fibrinogen und Thrombin enthaltenden wäßrigen Lösung in situ Fibrin erzeugt, und das entstehende Reaktionsgemisch tiefgefroren und lyophilisiert. Als weitere Bestandteile des Trockenpräparates kommen Wirkstoffe wie etwa Antibiotika, natürliches Knochenmaterial und/oder synthetischer, knochenbildender Ersatzstoff, Glykoproteine, gerinnungsfördernde Substanzen und dergleichen, und/oder Fibrinolyse-Inhibitoren in Betracht. Das Trockenpräparat ist vor allem als Wundversorgungsmaterial, Füllmaterial für Knochenhölräume und/oder als Trägermaterial für weitere Wirkstoffe vorgesehen.

EP 0 068 149 A2

BEST AVAILABLE COPY

1

5

10

**Fibrinogen-haltiges Trockenpräparat,
dessen Herstellung und Verwendung**

15

Die Erfindung betrifft ein Fibrinogen-haltiges Trockenpräparat mit einer durch Gefriertrocknung erzielten Schaum- bzw.
20 Vliesstruktur. Ein solches, vollständig resorbierbares Trockenpräparat kann insbesondere als Wundversorgungsmaterial, als Füllmaterial für pathologische Knochenhöhlräume und/oder als Trägermaterial für weitere, einen Heilprozeß fördernde Wirkstoffe verwendet werden. Weiterhin betrifft die Erfindung
25 ein Verfahren zur Herstellung dieses Trockenpräparates und dessen Anwendung.

Ein Trockenpräparat der genannten Art ist aus der DE-OS
30 37 513 bekannt. Hierbei handelt es sich um eine collagene Wundauflage, die durch Gefriertrocknung einer sowohl Collagen
35 wie Fibrinogen enthaltenden Lösung erhalten worden ist. Das gebildete Trockenmaterial kann zusätzlich einen Arzneimittelwirkstoff, etwa ein Antibiotikum, enthalten. Ein erheblicher Collagengehalt in einer Wundauflage - insbesondere wenn diese
resorbiert werden soll - ist nicht unbedenklich, wie nachstehend ausgeführt wird.

1 Ferner ist ein lyophilisierter Gewebekleber bekannt (vgl. DE-OS 30 02 934), der im wesentlichen - neben Fibrinolyse-Inhibitor und Faktor XIII - aus Fibrinogen und Albumin besteht und zusätzlich Glycin, Glucose und Heparin enthalten kann. Dieser Gewebekleber soll jedoch nicht in Form des Trockenpräparates auf der Wunde aufgebracht werden, sondern durch Zugabe von Wasser rekonstituiert werden, um eine konzentrierte Fibrinogen-Lösung zu erhalten, die daraufhin mit Thrombin und CaCl_2 versetzt wird.

10

Weiterhin ist mit der DE-OS 28 52 319 eine absorbierbare haemostatische Masse zur Verwendung bei der Bekämpfung von Knochenhaemorrhagien bekanntgeworden, die in einer wasserlöslichen, bioverträglichen Grundlage ein haemostatisches Pulver, nämlich ein Gemisch aus Fibrin- und Collagenpulver aufweist.

Schließlich sind aus der US-PS 3 523 807 nach Implantation vollständig resorbierbare Formkörper bekannt, die im wesentlichen aus Fibrin bestehen. Zur Herstellung wird Fibrin aus Plasma durch Calciumchlorid-Zugabe abgetrennt, der Niederschlag getrocknet und pulverisiert, das erhaltene Pulver gegebenenfalls mit anderem pulverförmigen Protein vermischt, das Pulver mit Wasser angeteigt und in einer Form zu dem gewünschten Formkörper gepreßt, der danach in einem Formaldehyd enthaltenden Bad gehärtet wird.

Die Gefriertrocknung (Lyophilisation) wässriger Protein-Lösungen ist in der Fachwelt bekannt. Man erhält eine lockere Schaum-, Filz- oder Vliesstruktur mit zahlreichen Hohlräumen, was zur Folge hat, daß ein derartiges Trockenpräparat eine große Saugfähigkeit für Körperflüssigkeiten aufweist. Die Herstellung eines Collagenproduktes mit filz- bzw. vliesartiger Faserstruktur durch Gefriertrocknung einer wässrigen Collagen-Lösung ist beispielsweise in der DE-OS 26 25 289 beschrieben. Derartige Collagen-Trockenpräparate zeichnen sich durch eine hohe mechanische Festigkeit aus, so daß man solche Collagenvliese schneiden und biegen kann.

Würde man dagegen unter vergleichbaren Bedingungen eine wässrige Fibrinogen-Lösung durch Gefriertrocknung zu einem Trockenpräparat verarbeiten, so würde man eine Proteinplatte mit schaumartiger Struktur erhalten, die leicht bricht und zerkrümelt. Wegen ihrer unzureichenden mechanischen Festigkeit wäre eine solche Platte als Wundversorgungsmaterial und/oder Trägermaterial für Arzneimittel-Wirkstoffe nicht geeignet.

10 Trotz ihrer haemostatischen Wirkung und hohen Stabilität (mechanische Festigkeit, Lagerfähigkeit) haben gefriergetrocknete und andere Collagenprodukte bei der Anwendung als Wundversorgungsmaterial und/oder als resorbierbares Implantat in der Praxis nicht völlig befriedigt. Nachteilig ist bei-
15 spielsweise die lange Verweildauer von bis zu 6 Wochen und mehr im Wundgebiet und unerwünschte Auswirkungen von Collagen auf bestimmte Heilungsprozesse, beispielsweise bei Knochenfrakturen. Bekannte Collagenpräparate sind häufig im Verlauf ihrer Abtrennung aus natürlichem Material und Zubereitung
20 denaturiert worden, so daß ein unlösliches Präparat mit schlechtem Resorptionsverhalten resultiert. Im Gegensatz dazu enthalten leicht lösliche Collagenpräparate stets einen sauren pH-Wert erzeugende Salze. Nach Einbringen in eine Wunde erzeugen solche Collagenpräparate dort wiederum eine saure Umge-
25 bung, deren Neutralisierung den Organismus unnötig belastet und den Heilungsprozeß beeinträchtigt. Gerade die Wundheilung und die durch Thrombin induzierte Fibrinbildung aus vorhandenem löslichen Fibrinogen benötigen für den optimalen Verlauf eine Umgebung mit physiologischem pH-Wert von etwa 7,36.
30 Schließlich ist Collagen im Wundgebiet in den körpereigenen Strukturen, Geweben und Flüssigkeiten schon in physiologisch verwertbarer Form vorhanden, so daß ein erhebliches zusätzliches Collagenangebot weder notwendig noch wünschenswert ist.

35 Natürliches Wundverschlußmaterial stellt ein aus Fibrinogen gebildetes Fibrin in gelartigem Zustand dar, das immer noch einen großen Anteil an nativem Fibrinogen enthält. Die in vitro Bereitstellung eines Trockenpräparates, das dem

1 natürlichen Wundverschlußmaterial mehr angeglichen ist, als
herkömmliche Collagen-Trockenpräparate, und das dennoch die
vorteilhaften Eigenschaften solcher Collagenpräparate auf-
weist, wie etwa hohe mechanische Festigkeit, gute Saugfähig-
5 keit und großes Flüssigkeits-Festhaltevermögen sowie unbe-
grenzte Lagerfähigkeit bei Raumtemperatur, würde zu einer er-
heblichen Verbesserung der medizinischen Versorgung führen.

Davon ausgehend besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfin-
10 dung darin, ein Fibrinogen-haltiges Trochenpräparat der oben
angegebenen Art bereitzustellen, das völlig oder weitgehend
Collagen-frei ist und dennoch die vorteilhaften Eigenschaften
üblicher Collagenpräparate aufweist, das hinsichtlich seiner
Zusammensetzung, seiner physiologischen Eigenschaften und
15 seines Resorptionsverhalten besser an natürliches Wundver-
schlußmaterial angeglichen ist und das unmittelbar, d.h.
ohne weitere Manipulationen, wie etwa die Zugabe von zusätz-
lichen und/oder aktivierenden Komponenten auf der Wunde app-
lizierbar ist und dort eine beschleunigte Haemostase bewirkt.
20

Die erfindungsgemäße Lösung dieser Aufgabe ist ein durch
Gefriertrocknung erhaltenes Vlies, das neben Thrombin in
zumindest katalytisch wirksamen Mengen im wesentlichen aus
etwa 10 bis 95 Gew.-% Fibrin und etwa 5 bis 90 Gew.-%
25 Fibrinogen besteht.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung eines solchen
Trockenpräparates sieht vor, in einer Fibrinogen und Thrombin
enthaltenden wässrigen Lösung in situ Fibrin zu erzeugen, und
30 das entstehende Reaktionsgemisch tiefzufrieren und zu
lyophilisieren.

Ein weiterer Gesichtspunkt der Erfindung betrifft die Ver-
wendung eines solchen Trockenpräparates zur akzelerierten
35 Haemostase und optimierten biochemischen Regelung des Wund-
verschlußes sowie zur Behandlung von Knochenmarksentzündungen.
Weiterhin kann das Trockenpräparat für die verschiedensten
Anwendungen als Trägermaterial bzw. als Wirkstoffdepot für

1 irgendwelche, einen Heilungsprozeß fördernde Wirkstoffe
dienen. Die Wirkstoff-Freisetzung aus dem Trockenpräparat
kann hinsichtlich Menge und Dauer durch seinen Fibringehalt,
durch zusätzliche Bestandteile, sowie durch einen bestimmten
5 Vernetzungs- und/oder Polymerisationsgrad des Fibrins ge-
steuert werden.

Vorteilhafte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Erfin-
dung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

10

Die Erfindung beruht auf der Beobachtung, daß durch Gefrier-
trocknung eines Reaktionsgemisches, das neben Fibrinogen und
zumindest katalytischen Mengen Thrombin in situ gebildetes
Fibrin enthält, ein Trockenpräparat erhalten wird, das eine
15 überraschend hohe Festigkeit, vergleichbar mit der Festigkeit
gefriergetrockneter Collagenprodukte, aufweist. Ein solches
Trockenpräparat weist auch ohne den Zusatz weiterer, die
Blutgerinnung fördernder Substanzen und Faktoren eine beson-
ders hohe haemostatische Aktivität auf, insbesondere wegen
20 des zusätzlichen Angebotes an wirksamem Thrombin und Fibri-
nogen. Das mit dem Trockenpräparat angebotene, in situ ge-
bildete Fibrin ist vorzugsweise lediglich in seiner Längs-
richtung vernetztes, also im wesentlichen nur über seine
Y-Ketten verknüpftes, insbesondere dimerisiertes Fibrin
25 hoher biologischer Aktivität, das als Ansatzpunkt für eine
weitere und verstärkte Fibrinbildung im Wundbereich dient.
Mit dem erfindungsgemäßen Trockenpräparat kann ein Komponen-
tengemisch angeboten werden, das große Ähnlichkeit mit dem
natürlichen Wundverschlußmaterial aufweist, das deshalb vom
30 Organismus ohne weiteres angenommen und vollständig resor-
biert wird. Ein erfindungsgemäß als Wundversorgungsmaterial
konfektioniertes Trockenpräparat, etwa in der Form eines 6
bis 20 mm starken Vlieses, vermag auch starke Blutungen in
kurzer Zeit, etwa in 2 Min. zum Stillstand bringen.

35

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen Trockenpräparates geht
man von einer wässrigen oder überwiegend wässrigen Lösung aus.
Bei dieser Ausgangslösung kann es sich um Wasser, Human-Serum

1 oder um eine wässrige Salzlösung handeln. Die wässrige Salz-
lösung kann eine physiologische Kochsalzlösung sein, oder
eine physiologische Kochsalzlösung, die zusätzlich mit CaCl_2
und Phosphatsalzen angereichert worden ist. Der pH-Wert und
5 der Salzgehalt dieser Ausgangslösung soll den physiologischen
Bedingungen weitgehend entsprechen. In manchen Fällen kann
es zweckmäßig sein, eine überwiegend wässrige Lösung zu ver-
wenden, die neben Wasser wasserlösliche, organische Lösungs-
mittel enthält, beispielsweise, um die Löslichkeit für be-
10 stimmte Arzneimittel-Wirkstoffe zu erhöhen. Zu geeigneten
organischen Lösungsmitteln gehören einwertige Alkohole wie
Äthanol oder Isopropanol, mehrwertige Alkohole wie Glycerin
oder Polyglykole, cyclische Äther wie Dioxan und dg.. Der
maximale Anteil an organischem Lösungsmitteln wird dahin-
15 gehend ausgewählt, daß jegliche Denaturierung und/oder Akti-
vitätsabnahme der eingesetzten Enzyme unterbleibt und die
Trocknung der gefrorenen Masse nicht beeinträchtigt wird.
Zumeist soll der Anteil an organischem Lösungsmittel 20 %
des Volumens des Gesamtansatzes nicht übersteigen.

20

Die Ausgangs-Lösung wird mit Human-Fibrinogen versetzt. Ge-
eignete Präparate sind handelsüblich zugänglich und können
beispielsweise von der Firma Behring-Werke, Marburg, bezogen
werden. Ein gut geeignetes Fibrinogen-Präparat kann ferner
25 entsprechend nachstehendem Verfahren erhalten werden.

- Human-Plasma wird auf 4°C abgekühlt und unter Rühren mit
 β -Alanin (2 molare Lösung in Äthanol) versetzt, bis unter
weiterer Äthanol-Zugabe das Rohfibrinogen ausfällt. Dieses
30 Rohfibrinogen wird abzentrifugiert, in 0,01 M Tris-Puffer
(pH-Wert 7,4) gelöst und durch Zusatz von 2 M Glycin erneut
gefällt. Das abgetrennte Sediment wird in 0,9%-iger wässriger
NaCl-Lösung gelöst, gegen das gleiche Lösungsmittel dialy-
siert, entsalzt und anschließend lyophilisiert. Das erhaltene
35 mikrokristalline Fibrinogen weist ein Molekulargewicht von
 $340\,000 \pm 5\%$ auf, ist in der α -Kette leicht angedaut,
löst sich nach Einbringen in Körperflüssigkeit schnell, und
beginnt unmittelbar darauf zu polymerisieren. Der in Lösung

1 gerinnbare Anteil des Fibrinogens macht wenigstens 85 % aus.

Die oben genannte, vorzugsweise bei Raumtemperatur gehaltene Ausgangs-Lösung wird pro 1 ml Lösung mit etwa 10 bis 5 90 mg Fibrinogen versetzt. Vorzugsweise ist eine relativ hohe Fibrinogen-Konzentration von etwa 50 bis 80 mg/ml vorgesehen. Sofern eine Verschäumung der Lösung unterbleibt, weist das nach der Gefriertrocknung erhaltene Präparat praktisch das Volumen der Ausgangs-Lösung auf. Eine höhere 10 Fibrinogen-Konzentration in der Ausgangs-Lösung führt daher zu einem dichteren Endprodukt mit höherer mechanischer Festigkeit.

Das zugesetzte Fibrinogen wird in der Ausgangslösung gelöst, 15 wozu bei Raumtemperatur gerührt werden kann.

Nach einem alternativen Verfahren ist es nicht erforderlich, zuerst das Fibrinogen in reiner, fester Form zu isolieren, und daraufhin einer wässrigen Lösung zuzusetzen. Beispiels- 20 weise kann das bei der oben beschriebenen Fibrinogen-Gewinnung beschriebene, nach der Glycin-Fällung erhaltene Sediment in 0,9 %-iger, wässriger NaCl-Lösung gelöst und auf den gewünschten Konzentrationsgrad eingestellt werden, und unmittelbar zu dieser Lösung die weiteren Zusätze hinzuge- 25 fügt werden, wie das nachstehend ausgeführt ist. Auch andere Fibrinogen-Lösungen sind geeignet, zu deren Herstellung das Rohfibrinogen als Kryopräzipitat vom restlichen Serum mit seinen Proteinen und Faktoren abgetrennt worden ist, beispielsweise entsprechend dem Verfahren nach der DE-OS 30 30 02 934. Wichtig ist eine weitgehende Abtrennung der die spontane Fibrinbildung auslösenden Enzyme und/oder Faktoren, so daß in der Ausgangslösung ein erheblicher Gehalt an stabilisierend wirkenden Salzen wie Citrat, Phosphat, Oxalat oder dgl. vermieden wird. Gerade das als Wundversorgungsmaterial vorgesehene Trockenpräparat soll ein Komponentenge- 35 misch liefern, das dem natürlichen Wundverschlußmaterial weitgehend angeglichen ist. Insbesondere für diese Anwendung sollen un-physiologische Salzkonzentrationen in der

1 Fibrinogen-Ausgangs-Lösung vermieden werden. Andererseits
kann bei der Bereitstellung dieser Ausgangslösung bereits
auf eine Anreicherung an Gerinnungsfaktoren, etwa Faktor XIII
hingearbeitet werden. Der Fibrinogengehalt einer solchen
5 Fibrinogen-Ausgangslösung soll ebenfalls 10 bis 90 mg, vor-
zugsweise 50 bis 80 mg Fibrinogen pro 1 ml Lösung betragen.

Die nach dem einen oder anderen Verfahren erhaltene Fibrino-
gen-Lösung kann sterilisiert werden, insbesondere gezielt
10 zur Inaktivierung von Viren wie etwa Hepatitis-Viren, be-
handelt werden. Beispielsweise kann hierzu eine Behandlung
mit B-Propiolacton, gefolgt von einer UV-Bestrahlung, vor-
gesehen werden. Alternativ kann mit energiereicher γ - oder
Röntgenstrahlung sterilisiert werden.

15 Anschließend können der Fibrinogen-Lösung die wahlweise vor-
gesehenen Zusätze und Wirkstoffe hinzugefügt werden.

Die Biegsamkeit, mechanische Festigkeit und Stabilität des
20 Trockenpräparates kann durch die Beimischung verschiedener
Glykoproteine gesteuert werden. Hierzu kann der Fibrinogen-
Lösung ein oder mehrere Glykoproteine wie Albumin, Lipopro-
tein, Fibronectin und/oder Globulin (α -, β -, γ -Globuline)
zugesetzt werden. Für diese Glykoproteine kann ein Anteil
25 von etwa 3 bis 40, vorzugsweise von etwa 5 bis 25 Gew.-%
des fertigen Trockenpräparates vorgesehen werden. Derartige
Glykoproteine dienen auch als Trockenhalte- und Stabilisie-
rungsmittel und beugen einem Aktivitätsverlust der Gerinnungs-
enzyme während langer Lagerdauer vor.

30

Sofern das Trockenpräparat gezielt als Trägermaterial oder
Depotstoff für bestimmte Wirkstoffe dienen soll, können
diese, sofern sie wasserlöslich sind, und durch die Gefrier-
trocknung nicht geschädigt werden, ebenfalls der Fibrinogen-
35 Lösung zugesetzt werden. Der Ausdruck "Wirkstoff" wird in
einem sehr breiten Sinn verstanden und umfaßt alle Zusammen-
setzungen, die auf parenteralem Wege zur Heilung, Linderung,
Behandlung und/oder Verhinderung von Gesundheitsstörungen

1 bei Mensch und Tier wirksam sind oder die Funktion des Orga-
nismus zu beeinflussen vermögen. Vor allem kommen hier anti-
bakterielle Wirkstoffe, insbesondere Antibiotika, in Betracht.
Zu geeigneten Antibiotika gehört etwa die Gruppe der Amino-
5 glykosid-Antibiotika, wie etwa Gentamycin, die Lacton-Anti-
biotika wie etwa Novobiocyn, die Gruppe der Penicilline wie
etwa Baycillin oder Amoxycillin, das Chloramphenicol und des-
sen Derivate, wie etwa Tiamphenicol und sonstige Antibiotika,
wie etwa die Gruppe der Streptomycine, die Gruppe der Tetra-
10 cycline und dgl.. Zu weiteren geeigneten antibakteriellen
Wirkstoffen gehören beispielsweise die Sulfonamide. Wegen
ihres breiten Wirkungsspektrums sind die Aminoglykosid-Anti-
biotika, hier insbesondere Gentamycin, besonders bevorzugt.
Weiterhin kann eine Kombination verschiedener Antibiotika,
15 beispielsweise Gentamycin, zusammen mit Tetracyclin, vorge-
sehen werden. Zu weiteren, geeigneten Wirkstoffen anderer
Indikation gehören die Antiseptika wie etwa Salicylsäure
oder Undecensäure, ferner die Entzündungshemmer wie etwa
Pyrazolone und ferner die Cytostatika wie etwa Prednison.
20

Die Menge dieser Wirkstoffe kann in weiten Bereichen schwan-
ken und hängt hauptsächlich von der Wirkstoffaktivität ab.
Bezogen auf das Gesamtgewicht des Trockenproduktes kann der
Wirkstoffgehalt etwa 0,1 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise etwa
25 2 bis 6 Gew.-% betragen. Beispielsweise hat sich ein Genta-
mycin-Zusatz von etwa 500 bis 10 000 Einheiten pro 1 ml
Fibrinogen-Lösung gut bewährt.

30 Sofern das Trockenpräparat gezielt in Knochenhöhlen einge-
bracht werden soll, um dort als Wirkstoffdepot mit zeitlich
und mengenmäßig gezielter Wirkstoff-Freisetzung zu dienen
und zugleich die Knochennachbildung zu fördern, können ge-
zielt das Knochenwachstum fördernde Zusätze vorgesehen wer-
den. Hierzu gehören beispielsweise natürliches feinteiliges
35 Knochenmaterial wie denaturiertes Knochenmehl oder lyophil-
sierte Knochenpartikel, die anschließend pulverisiert worden
sind, und/oder synthetischer, knochenbildender Ersatzstoff,
wie etwa anorganische Salze des Kaliums, Magnesiums und

1 und Calciums, insbesondere Calciumphosphat und hier beson-
ders bevorzugt Tricalciumphosphat. Für diesen besonderen An-
wendungszweck kann der Anteil an das Knochenwachstum fördern-
den Zusätzen relativ hoch gewählt werden und vorzugsweise
5 etwa 50 Gew.-% des fertigen Trockenpräparates ausmachen.

In Verbindung mit den genannten Wirkstoffen kann ein Zusatz
vorgesehen werden, welcher die Wirkstoff-Freisetzung zeit-
lich und mengenmäßig steuert. Zu wirksamen Zusätzen dieser
10 Art gehören Collagen und vernetztes Fibrin. Die Wirksamkeit
dieser Zusätze hängt von der Affinität zu dem ausgewählten
Wirkstoff ab. Für zahlreiche Wirkstoffe, insbesondere die
wichtige Gruppe der Antibiotika und hier insbesondere Genta-
mycin, hat sich ein Anteil von die Wirkstoff-Freisetzung
15 steuernden Zusätzen von etwa 2 bis 12 Gew.-%, vorzugsweise
von etwa 4 bis 10 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht des
Trockenpräparates, als ausreichend erwiesen. Besonders bevor-
zugt wird zu diesem Zweck ein Collagengehalt von etwa 0,5
bis 1 Gew.-%. Zu diesem Zweck kann der Fibrinogen-Lösung in
20 geeigneter Menge wasserlösliches Collagen zugesetzt oder das
Fibrinogen in einer entsprechenden wässrigen Collagen-Lösung
gelöst werden. Derartige Collagenmengen sind in dem Gesamt-
ansatz ohne weiteres löslich, so daß die oben genannten
Schwierigkeiten (saurer pH-Wert und/oder un-physiologische
25 Salzkonzentrationen) nicht auftreten. Weiterhin kann die
Wirkstoff-Freisetzung durch den Fibringehalt und/oder das
Ausmaß der Fibrinvernetzung beeinflusst werden. Zumeist ver-
zögern ein höherer Fibringehalt sowie eine stärkere Fibrin-
vernetzung die Wirkstoff-Freisetzung. Eine geeignete Fibrin-
30 vernetzung kann beispielsweise durch Zusatz von Glutaral-
dehyd bewirkt werden.

Sofern das Trockenpräparat gezielt als Wundversorgungsmate-
rial eingesetzt werden soll, kann ein gefriergetrocknetes
35 Vlies mittlerer haemostatischer Wirksamkeit erzeugt werden,
dem nachträglich ein hochwirksames, angereichertes, pulver-
förmiges Plasmaderivat zur akzelerierten Haemostase und
optimierten Regelung des Wundverschlusses zugesetzt wird,

1 wie das nachstehend noch im einzelnen ausgeführt wird.
Alternativ können bereits der Fibrinogen-Lösung die wesent-
lichen Komponenten dieses angereicherten Plasmaderivates zu-
gesetzt werden. Zu den Hauptbestandteilen dieses Plasmaderi-
5 vates gehören Fibrinogen, Thrombin, Komponenten des Pro-
thrombinkomplexes und Protease-Inhibitoren; ferner können
Beimischungen von Blutplättchenextrakten, Antibiotika und dgl.
vorgesehen werden. Mehr im einzelnen kann zu diesem Zweck
ein Zusatz von Phospholipiden, Prostaglandinen, Gerinnungs-
10 faktoren, Antihistaminika, Vasopressinen, Wachstumsfakto-
ren, Vitaminen, und dgl. vorgesehen werden. Die Anwesenheit
von Prostaglandinen fördert die Aktivierung des Kapillar-
bettes im Wundgebiet, sowie die Aktivierung der im Blutstrom
befindlichen Plättchen. Die Blutgerinnungsfaktoren, bei-
15 spielsweise Faktor XIII, Blutplättchen-Extrakte und andere,
zur Blutgerinnung notwendigen Faktoren wie etwa Leukotriene,
Plättchen-aktivierender Faktor, unterstützen und verstärken
die Wirkung der in der Körperflüssigkeit vorhandenen Fakto-
ren im Sinne einer akzelerierten Haemostase und einer Opti-
20 mierung des Wundverschlusses. Als Phospholipid dient vor-
zugsweise ein aus humanem Vollblut gewonnener Thrombozyten-
extrakt. Weitere geeignete Phospholipide sind etwa Extrakte
aus Gehirnschubstanz. Die Gerinnungsfaktoren VIII und IX die-
nen zur haemophilen Wundversorgung. Ein Zusatz von Adrenalin
25 und/oder Ergotamin wirkt gefäßaktiv, was im Ergebnis zu einer
schnelleren Blutgerinnung führt. Im Hinblick auf ihre hohe
spezifische Wirksamkeit macht die Summe der Anteile an
Prostaglandinen, Phospholipiden, Gerinnungsfaktoren und den
weiteren genannten Wirkstoffen zumeist nicht mehr als 1,2
30 Gew.-%, vorzugsweise nicht mehr als 0,8 Gew.-% des fertigen
Trockenpräparates aus. Die genannten Substanzen in den ge-
nannten Mengen werden ebenfalls der Fibrinogen-Lösung, vor
oder gemeinsam mit der Thrombinzugabe, hinzugefügt.

35 Ferner kann ein Fibrinolyse-Inhibitor zugesetzt werden. Vor-
zugsweise ist ein relativ hoher Anteil an Fibrinolyse-Inhi-
bitor vorgesehen, nämlich wenigstens 5000 Einheiten (sog.
KIE, nämlich Kalikrein-Inaktivator-Einheiten), vorzugsweise

- 1 jedoch 10 000 und mehr Einheiten Fibrinolyse-Inhibitor pro
1 ml Lösung. Als Fibrinolyse-Inhibitor kommen beispielsweise
Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder ein oder mehrere Anti-
plasmine, wie etwa α_1 -Antiplasmin, α_2 -Makroglobulin oder Apro-
5 tinin, sowie ϵ -Aminocaprinsäure und/oder Trypsin-Inhibitor in
Betracht. Gut bewährt hat sich beispielsweise der von der
Bayer AG, Leverkusen, unter der Handelsbezeichnung "Trasylo1"
vertriebene natürliche Fibrinolyse-Inhibitor.
- 10 Nachdem einer oder mehrere der genannten, oder andere, auf
einen bestimmten Anwendungszweck hin ausgewählte Wirkstoffe
der Fibrinogen-Lösung zugesetzt wurden und darin vollständig
oder weitgehend gelöst worden sind, erfolgt die Zugabe von
Thrombin. Bekanntlich vermag Thrombin von einem Fibrinogen-
15 Molekül die Fibrinopeptide A und B abzuspalten, wodurch ein
Fibrin-Monomer entsteht, das sich dann spontan mit anderen
Fibrin-Monomeren umsetzt, so daß schließlich ein Polymerisat
aus Fibrinmolekülen entsteht. Das zugesetzte Thrombin soll
unter bekannten, standardisierten Bedingungen wenigstens
20 eine biologische Aktivität von 10 000 Einheiten (NIH-Einhei-
ten gemäß dem Standard des National Institut of Health der
U.S.A.) pro 1 mg Thrombin aufweisen. Geeignete Präparate
sind handelsüblich zugänglich. Beispielsweise kann geeignetes
Thrombin in mikrokristalliner Form mit einer biologischen
25 Aktivität von wenigstens 3 000 Einheiten/mg Präparat (das
neben Thrombin bekannte Stabilisierungsmittel und Trägerma-
terialien enthält) unter der Handelsbezeichnung "Topostasin"
von Hoffmach LaRoche, Grenzach, Baden, bezogen werden.
- 30 Ein Teil der gewünschten Thrombinaktivität kann auch in Form
von Thrombin-bildenden Vorstufen, wie etwa Prothrombin, zuge-
setzt werden. Auch Prothrombin-Konzentrate sind handelsüblich
zugänglich, beispielsweise als PPSB-Präparat der Firma
Immuno AG, Wien. Ferner kann ein kombiniertes, Thrombin und
35 Prothrombin enthaltendes Präparat durch Säulenchromatographie
aus käuflichem Prothrombinkomplex abgetrennt oder aus Human-
Plasma durch Bariumsulfat extrahiert und aus dem kristallinen
Niederschlag zurückgewonnen werden.

1 Der Anteil an zugesetztem, wirksamen Thrombin hängt von verschiedenen Faktoren ab. Hinsichtlich der Verfahrensbedingungen beschleunigt eine hohe Thrombinkonzentration die Fibrinbildung, so daß bei hohen Thrombinkonzentrationen das Reaktionsgemisch nach relativ kurzer Zeitspanne tiefgefroren werden muß, um noch einen ausreichenden Fibrinogengehalt zu gewährleisten. Hinsichtlich des Endproduktes und dessen verschiedenen Anwendungen wird für ein Wundversorgungsmaterial ein relativ hoher Thrombingehalt gewünscht, um gemeinsam mit dem zusätzlichen Fibrinogenangebot die Haemostase zu beschleunigen. Zur Herstellung eines Wundversorgungsmaterials, das auch ohne nachträgliche Zugabe von gerinnungsaktiven Enzymen und Faktoren eine befriedigende haemostatische Wirkung zeigt, kann die Fibrinogen-Lösung mit relativ hohen Thrombinmengen, beispielsweise mit 20 bis 30 und mehr Einheiten Thrombin pro 1 ml Lösung versetzt werden. Für andere Anwendungsfälle, etwa als Trägermaterial für Wirkstoffe wie Antibiotika, ist der Thrombingehalt des Endproduktes von geringerer Bedeutung; in diesem Fall genügt ein geringer Thrombinzusatz, der ausreicht, das vorgelegte Fibrinogen innerhalb angemessener Zeitspannen zu dem angestrebten hohen Anteil von mehr als 50 % zu Fibrin umzusetzen. In diesem Falle reichen katalytisch wirksame Mengen Thrombin von wenigstens 0,1 Einheiten, vorzugsweise von etwa 5 bis 10 Einheiten pro 1 ml Fibrinogen-Lösung aus.

Sofern un-physiologisch hohe Salz- und/oder Stabilisierungsmittel-Konzentrationen nicht vorliegen, erzeugt Thrombin aus Fibrinogen in wässrigem Medium polymerisierbare Fibrinmonomere. Die Natur des aus diesen Monomeren gebildeten Polymerisates hängt von verschiedenen Faktoren ab. Würde man den Fibrinogen- und Thrombin-haltigen Ansatz sich selbst überlassen, so wäre nach etwa 4 bis 6 Stunden das gesamte Fibrinogen umgesetzt, und man erhält ein steifes Gel, das beim Schütteln zu Fibrinfäden zusammenfällt. In diesem Fall ist die Polymerisation über die α - und γ -Ketten der Fibrinmonomere erfolgt. Würde man den erhaltenen Niederschlag lyophilisieren, so würde man ein hartes, brüchiges Produkt erhalten,

1 das wegen seiner geringen mechanischen Festigkeit und Biegsamkeit, sowie wegen seiner verminderten Löslichkeit und verzögerten Abbaubarkeit als Wundversorgungsmaterial weniger geeignet ist.

5

Die ausschließliche Polymerisation der Fibrinmonomere ergibt ein lösliches, wenig stabiles Polymerisat, das überwiegend durch Wasserstoffbrücken-Bindungen, elektrostatische Wechselwirkungen, Hydratation und dgl. stabilisiert ist. Eine höhere
10 Stabilität resultiert aus der Bildung kovalenter Bindungen zwischen benachbarten Fibrinmolekülen. Hierzu ist bekanntlich die Anwesenheit von Faktor XIII erforderlich, der seinerseits in Anwesenheit von CaCl_2 durch Thrombin aktiviert wird. In Abhängigkeit von den Herstellungsbedingungen enthält festes
15 oder gelöstes Fibrinogen praktisch immer einen kleineren oder größeren Anteil an Faktor XIII. Häufig wird die Abscheidung des Rohfibrinogens aus dem Plasma unter solchen Bedingungen durchgeführt, daß zusammen mit dem Rohfibrinogen auch Faktor XIII abgeschieden wird. Die Erzeugung von kova-
20 lenten Bedingungen kann in den verschiedenen Seitenketten benachbarter Fibrinmoleküle stattfinden, welche in unterschiedlichem Ausmaß zur Längs- und Quervernetzung des Fibrinpolymerisates beitragen.

25 Im Rahmen der Erfindung ist erkannt worden, daß ein überwiegend längs vernetztes, lösliches Fibrinpolymerisat erhalten werden kann, wenn die Erzeugung kovalenter Bindungen rechtzeitig abgebrochen wird, da die zur Quervernetzung erforderlichen kovalenten Bindungen langsamer gebildet werden,
30 als die zur Längsvernetzung erforderlichen kovalenten Bindungen. Das In-Gang-Kommen der Quervernetzung macht sich durch einen deutlichen Viskositätsanstieg des Ansatzes bemerkbar. Zur Kontrolle der abgeschlossenen γ -Kettendimerisierung kann die Viskosität der Fibrinogen/Fibrinmonomeren-
35 Lösung überwacht werden. Bricht man die Reaktion nicht rechtzeitig ab, so kann unter der Wirkung der α -Kettenpolymerisierung die Viskosität den 10-fachen Wert der Viskosität der Ausgangslösung erreichen. Zur Erzeugung eines erfindungsge-

1mäßen Trockenpräparates ist eine Fibrinogen/Fibrinmonomeren-Lösung dann gut geeignet, wenn ihre Viskosität den doppelten Wert der Ausgangsviskosität erreicht hat, weil dann die γ -Kettendimerisierung weitgehend abgeschlossen ist, und die α -Kettenpolymerisierung noch nicht nennenswert eingesetzt hat. Abhängig von der Thrombin- und der Faktor XIII-Konzentration ist die Verdoppelung der Ausgangsviskosität in der Regel 30 bis 40 min nach der Thrombinzugabe erreicht.

10Für viele Anwendungsfälle, insbesondere als Wundversorgungsmaterial, ist ein überwiegend längs vernetztes Fibrinpolymerisat erwünscht, da dieses leichter löslich ist, eine größere physiologische Aktivität aufweist und große Mengen Thrombin gebunden enthält und deshalb für eine schnelle Blut-
15gerinnung angestrebt wird. Weiterhin kann gerade solches überwiegend längs vernetztes Fibrin, nämlich überwiegend nur γ -kettendimerisiertes Fibrin in der Lösung verschäumt oder durch Zusatz von Glutaraldehyd nach Bedarf vernetzt werden.

20Als Anhaltspunkt für das Ausmaß der Quer- und Längsvernetzung des Fibrinpolymerisates kann die α -Polymeren- und γ -Dimeren-Bildung gemessen werden. Hierzu wird Fibringemisch in Natrium-Laurylsulfat-haltigem Puffer mit Zusätzen an Mercaptoaethanol gelöst und in Polyacrylamidgelen elektrophoretisch getrennt.

25

Sofern ein überwiegend längs vernetztes Fibrinpolymerisat angestrebt wird, soll die Reaktionsdauer des Ansatzes nach der Thrombinzugabe auf maximal 40 min beschränkt werden. Vorzugsweise ist nach der Thrombinzugabe eine Reaktionsdauer von

30 etwa 10 bis 30 min vorgesehen. Unter diesen Bedingungen wird ein Fibrinpolymerisat erhalten, das vorwiegend γ -Ketten-Dimeren enthält und im wesentlichen frei von α -Kettenpolymeren ist. Ergänzend kann die Fibrinbildung in Gegenwart von SH-Gruppenblockierenden Substanzen wie beispielsweise Jodazetat durchgeführt werden. Hierdurch wird der Anteil an Fibrin, das in
35 Form von Fibrinmonomeren vorliegt, gesteigert.

1 Unabhängig davon kann für manche Anwendungsfälle auch ein
höheres Maß an Quervernetzung erwünscht sein, insbesondere
wenn das Trockenpräparat einen besonders hohen Fibringehalt
von mehr als 80 Gew.-% aufweisen soll. Ein hohes Maß an
5 Quervernetzung ergibt ferner eine dichtere Struktur und er-
höht die Verweildauer des Trockenpräparates im Gewebe. Sofern
ein höheres Maß an Quervernetzung angestrebt wird, kann die
Reaktionsdauer nach der Thrombinzugabe auch mehr als 40 min
betragen und auf mehrere Std. ausgedehnt werden. Auch die
10 nach der Gefriertrocknung der dabei entstehenden Gele erhal-
tenen Trocken-Präparate sollen von der vorliegenden Erfindung
umfaßt sein. In diesem Falle ist es wünschenswert, eine Zer-
störung der Gelstruktur zu vermeiden, weshalb der Ansatz un-
mittelbar nach der Thrombinzugabe und kurzzeitigem Umrühren
15 in die Gefriertrocknungsform gegeben wird, für die vorgesehene
Reaktionsdauer unbewegt bei Raumtemperatur gehalten wird und
darauf schnell abgekühlt wird.

Darüberhinaus kann die Vernetzung des Fibrinpolymerisates
20 auch durch die Zugabe von Vernetzungsmitteln gesteuert wer-
den. Zu geeigneten Vernetzungsmitteln gehören beispielsweise
zweiwertige, brücken-bildende Stoffe wie etwa SPDP,
nämlich N-Succinimidyl-3-(2-pyridyl-dithio)-propionate,
oder zweiwertige, mit den vorhandenen Aminogruppen Peptid-
25 bindungen erzeugende organische Substanzen wie etwa Formalde-
hyd, Glutaraldehyd, Malonyldialdehyd, Adipinsäure und/oder
deren Derivate. Im Hinblick auf ihre hohe Wirksamkeit kann
die zugesetzte Menge an Vernetzungsmittel recht gering ge-
halten werden und beispielsweise nur 0,1 bis 5 % des gesamten
30 Ansatzes betragen. Gut bewährt hat sich beispielsweise ein
Zusatz von 3 ml Glutaraldehyd zu einem 100 ml Ansatz. Eine
solche Vernetzung erhöht auch die Zug- und Reißfestigkeit des
gebildeten Trockenpräparates.

35 Erfindungsgemäß wird das in dem Trockenpräparat enthaltene
Fibrin somit in situ in einem wässrigen, Fibrinogen und
Thrombin enthaltendem Medium erzeugt. Das auf diese Weise
gebildete Fibrin erweist sich als wesentlich nativer,

1 löslicher und reiner als beispielsweise das durch CaCl_2 -
Fällung aus Humanplasma gefällte und abgetrennte Fibrin ge-
mäß US-PS 3 523 807. Das letztere Material ist praktisch
unlöslich, enthält Einschlüsse von anderen Plasmaproteinen
5 und ist deshalb für die Anwendung als Wundversorgungsmate-
rial weniger geeignet.

Vorzugsweise wird die in situ - Bildung von Fibrin unter
solchen Bedingungen durchgeführt, daß das erhaltene Fibrin-
10 polymerisiert kovalente Bindungen zwischen benachbarten Fibrin-
molekülen aufweist. Hierzu soll das Reaktionsgemisch wenig-
stens katalytisch wirksame Mengen an Faktor XIII enthalten;
vorzugsweise soll 1 ml Reaktionsgemisch wenigstens 0,5 bis
1 Einheiten Faktor XIII enthalten. Besonders bevorzugt ist
15 ein Fibrinpolymerisat dieser Art, dessen kovalente Bindungen
überwiegend zu einer Längsvernetzung geführt haben, d.h.,
der Anteil der eine Quervernetzung verursachenden kovalenten
Bindung an der Gesamtzahl aller kovalenten Vernetzungen soll
weniger als 2 % betragen. Als Anhaltspunkt für das Ausmaß
20 der Quervernetzung kann die Gelelektrophorese dienen. Das
besonders bevorzugte Fibrinpolymerisat ist wegen seiner γ -
Kettendimerisierung überwiegend längsvernetztes Fibrin.
Größere Komplexe können durch nachträgliche Polymerisierung
und/oder Vernetzung erzeugt werden.

25

Nachdem die Fibrinbildung, -polymerisation und -vernetzung
ausreichend weit fortgeschritten ist, wird der Ansatz tief-
gefroren. Hierzu wird rasch, beispielsweise innerhalb von
5 min auf eine Temperatur unterhalb -20°C , vorzugsweise
30 auf -40°C oder noch tiefere Temperaturen abgekühlt. Die
Wahl der Abkühlungstemperatur ist nicht von kritischer Be-
deutung, da Thrombin und die anderen Gerinnungsfaktoren
praktisch unterhalb 0°C keine nennenswerte Aktivität aufwei-
sen.

35

Das Material wird solange auf der Abkühlungstemperatur ge-
halten, bis der gesamte Ansatz durch und durch zu einem
massiven Eiskörper gefroren ist. Je nach Größe des Ansatzes

1 hat sich hierzu eine Verweildauer von etwa 20 bis 30 min
bei - 40°C in der Gefrierform gut bewährt.

Anschließend wird die Trocknung unter bekannten Bedingungen
5 durchgeführt. Hierzu bringt man den oder die Eiskörper in
eine Vakuumkammer und erwärmt so langsam, daß die verdunsten-
de Flüssigkeit stets abgeführt und an einer Kühlfalle nieder-
geschlagen werden kann, so daß sich das Tiefkühlprodukt
niemals verflüssigt. Sofern man bei einem Unterdruck von
10 weniger als 1 bis 60 Pa arbeitet, ist der Trocknungsvor-
gang in etwa 3 bis 8 Stunden beendet.

Das erhaltene Produkt ist eine lockere Masse mit schaum-,
filz- oder vliesartiger Struktur. Bei der Prüfung unter dem
15 Mikroskop erkennt man bei 200-facher Vergrößerung ein in-
einander verwobenes Netzwerk aus feinen Fasern. Das erhal-
tene Vlies hat das Volumen des ursprünglichen Flüssigkeits-
ansatzes, und weist innerhalb des gesamten Vliesvolumens
eine homogene, einheitliche Zusammensetzung auf. Zumeist
20 liegt das spez. Gewicht der Vliesstruktur zwischen etwa
0,1 und 0,5 g/cm³. Sofern ein noch lockereres und leichte-
res Material angestrebt wird, kann der flüssige Ansatz vor
dem Einfüllen in die Gefriertrocknungsform verschäumt wer-
den. Hierzu wird ein inertes Treibmittel wie etwa Stickstoff
25 oder Kohlendioxid in die Flüssigkeit eingeblasen. Durch Zu-
gabe oberflächenaktiver Mittel kann eine bestimmte Poren-
größe des gebildeten Schaumes eingestellt werden.

Die äußeren Abmessungen des nach der Gefriertrocknung er-
30 haltenen Vlieses sind an den jeweiligen Anwendungszweck an-
gepaßt. Für die Anwendung als Wundversorgungsmaterial eignet
sich gut ein etwa 6 bis 20 mm starkes Vlies mit einer Länge
von etwa 3 bis 12 cm und einer Breite von 1 bis 12 cm. Soll
das Trockenpräparat vorzugsweise als Wirkstoffdepot dienen
35 und in das Gewebe implantiert oder in Knochenhöhlen einge-
setzt werden, so haben sich stückige Formen bewährt, bei-
spielsweise Kugeln mit einem Durchmesser von etwa 1 bis
3 cm Würfel, mit einer Kantenlänge von etwa 1 bis 3 cm

1 oder Scheiben, Zäpfchen und dgl. mit ähnlichen Abmessungen. Zur Erzielung dieser äußeren Abmessungen wird der flüssige Ansatz zweckmäßigerweise in entsprechend geformte Gefrier-trocknungsformen eingefüllt.

5

Nach Abschluß des Trocknungsverfahrens wird das Trockenpräparat vorsichtig an einem Rand vom Formboden gelöst und abgezogen. Das erhaltene Vlies wird kurzzeitig auf einer Al-Folie abgelegt, soweit erforderlich, auf die gewünschten
10 Maße zurechtgeschnitten, und daraufhin in eine eingesenkte Plastikform eingelegt und die letztere mit einer Al-Folie verschlossen. Daraufhin kann die Verpackung samt Inhalt sterilisiert werden, beispielsweise mit Röntgenstrahlung (Dosis: 3 min lang 3000 rad). Das feuchtigkeitsdicht und
15 steril verpackte Produkt ist bei Raumtemperatur praktisch unbegrenzt lagerfähig, ohne nennenswert an Aktivität zu verlieren.

Wie bereits ausgeführt, bestehen für das erfindungsgemäße
20 Trockenpräparat verschiedene Anwendungsmöglichkeiten, und die Zusammensetzung des Trockenpräparates kann gezielt an den jeweiligen Anwendungszweck angepaßt werden.

Nach der allgemeinsten Ausführungsform der Erfindung soll
25 das Vlies neben Thrombin in zumindest katalytisch wirksamen Mengen im wesentlichen aus etwa 10 bis 95 Gew.-% Fibrin und etwa 5 bis 90 Gew.-% Fibrinogen bestehen. Unter "zumindest katalytisch wirksamen Mengen" wird ein Thrombingehalt von etwa 0,1 bis 10 Einheiten, vorzugsweise von 3 bis 8 Ein-
30 heiten pro 1 cm³ Vliesmaterial verstanden. Bei diesen "Einheiten" handelt es sich um die in der Fachwelt üblichen "NIH-Einheiten" (gemäß dem Standard des National Institut of Health der U.S.A.). Bei einem Fibringehalt von weniger als 10 Gew.-% überwiegt die Fibrinogen-Natur des Trocken-
35 präparates, so daß ein brüchiges Material mit unzureichender mechanischer Festigkeit vorliegt. Der Fibringehalt soll daher wenigstens 10 Gew.-%, vorzugsweise wenigstens 30 Gew.-% des Trockenpräparates ausmachen. Fibringehalte von

1 mehr als 95 Gew.-% erfordern Reaktionsbedingungen, die ein festes, physiologisch wenig aktives Material liefern, das vom Organismus nur schwer abgebaut werden kann. Der Fibrin-
gehalt soll deshalb nicht mehr als 95 Gew.-%, vorzugsweise
5 nicht mehr als 70 Gew.-% des Vliesgewichtes ausmachen. Ein Trockenpräparat mit einem Fibringehalt von etwa 20 bis 30 Gew.-% und mit einem Fibrinogengehalt von etwa 80 bis 70 Gew.-% liefert nach dem Anfeuchten mit Körperflüssigkeit ein dem natürlichen Wundverschlußmaterial besonders ähnliches
10 Präparat und wird daher besonders bevorzugt.

Sofern das erfindungsgemäße Trockenpräparat vor allem als blutstillendes und wundheilendes Wundversorgungsmaterial eingesetzt werden soll, soll das Vlies überwiegend aus
15 Fibrinogen bestehen. In diesem Falle hat sich ein Fibringehalt von etwa 10 bis 40 Gew.-% und ein Fibrinogengehalt von etwa 60 bis 90 Gew.-% gut bewährt. Das Wundversorgungsmaterial soll beim Befeuchten mit dem Wundsekret die Flüssigkeit aufnehmen, sich auflösen und eine hoch viskose, klebrige
20 Paste bilden, die an der Wundfläche haftet, dem Ausström-
druck des Blutes standhält und die Gerinnungsenzyme des kontaktierenden Blutes aktiviert. Zu dieser Aktivierung werden mit dem Trockenpräparat vorzugsweise zusätzlich gerinnungs-
fördernde Substanzen, gefäßaktive Stoffe, Gerinnungsfaktoren
25 und dgl. angeboten. Diese Komponenten können bereits in die zur Erzeugung des Trockenpräparates dienende Lösung eingebracht und gemeinsam mit dieser tiefgefroren und lyophilisiert werden. Vorteilhaft an dieser Alternative ist, daß die Komponenten in höchst feiner Verteilung innerhalb des
30 Trockenpräparates vorliegen, was deren Wirksamkeit noch weiter steigert. Alternativ können diese Komponenten in Form einer pulverförmigen Wirkstoffkombination nachträglich in das im wesentlichen nur aus Thrombin, Fibrin und Fibrinogen bestehende Trockenpräparat eingearbeitet werden. Dies
35 erlaubt die Anwesenheit von Wirkstoffen, deren Aktivität durch die Gefriertrocknung beeinträchtigt wird, und/oder außergewöhnlich hohe Thrombinkonzentrationen, welche die sonstige Verfahrensführung wegen der beschleunigten

1 Fibrinbildung einschränken würden.

Ein geeignetes pulverförmiges biochemisches Substrat zu ak-
zelerierten Haemostase und optimierten biochemischen Rege-
5 lung des Wundverschlusses, das pulverförmig auf dem vorge-
bildeten, erfindungsgemäßen Trockenpräparat aufgebracht
werden kann, ist im einzelnen in der europäischen Patentan-
meldung Nr. 8 111 0615.2 vom 18. Dezember 1981 beschrieben.
Mit der Bezugnahme auf diese europäische Patentanmeldung
10 soll deren Inhalt, soweit erforderlich, auch zum Bestandteil
der vorliegenden Unterlagen gemacht werden. Dieses pulver-
förmige, biochemische Substrat ist im Hinblick auf eine
optimierte Aktivierung des exogenen und/oder endogenen Ge-
rinnungssystems sowie unter Berücksichtigung einer Vielzahl
15 physiologischer und pathologischer Faktoren konfektioniert.
Dieses Substrat enthält u.a. Fibrinogen, Thrombin, Komponen-
ten des Prothrombinkomplexes, Proteaseinhibitoren. Je nach
Applikationszweck können zusätzlich Blutplättchen-Extrakte,
Antibiotika und dgl. in zweckmässigen Mischungsverhältnissen
20 beigefügt werden. Eine bevorzugte Ausführungsform dieses
Plasmaderivates besteht im wesentlichen aus 80 bis 94 Gew.-%
Fibrinogen, 1 bis 10 Gew.-% Thrombin und/oder Prothrombin
und 0,01 bis 3 Gew.-% Fibrinolyse-Inhibitor, enthält weniger
als 0,4 Gew.-% kälteunlösliches Globulin und kann darüber
25 hinaus zusätzlich Phospholipide, Prostaglandine, Trocken-
halte- und Stabilisierungsmittel, Antibiotika und/oder Blut-
gerinnungsfaktoren, alle in fester, pulverförmiger Form,
enthalten. Diese hochwirksame, pulverförmige Wirkstoffkombi-
nation kann in Anteilen von etwa 0,1 bis 5 Gew.-Teile auf
30 100 Gew.-Teile Trockenpräparat aufgebracht werden. Vorzugs-
weise werden diese geringen Mengen mittels eines sterilen
Gasstrahls auf die Oberfläche des Trockenpräparates aufge-
blasen und haften dort in ausreichender Menge. Das danach
erhaltene Fibrin/Fibrinogen-Vlies kann direkt zur Wundbe-
35 handlung verwendet werden oder in einen Schnellverband
(Heftpflaster) integriert werden. Auf diese Weise wird ein
Wundversorgungsmaterial erhalten, das an der Oberfläche
eines ausschließlich biologischen Trägermaterials eine

1 hochwirksame Wirkstoffkombination zur akzelerierten Haemostase und optimierten biochemischen Regelung des Wundverschlusses aufweist.

5 Ferner kann das erfindungsgemäße Trockenpräparat als Trägermaterial bzw. als Wirkstoffdepot für einen oder mehrere, irgendeinen Heilungsprozeß fördernde(n) Wirkstoffe(n) verwendet werden. Für diesen Anwendungszweck soll das Trockenpräparat überwiegend aus Fibrin bestehen. Ein hoher Fibrin-
10 gehalt gewährleistet eine hohe mechanische Festigkeit des Vlieses, eine ausreichende Verweildauer im Gewebe und die gewünschte Wirkstoff-Freisetzung über einen längeren Zeitraum hinweg. Zusätzlich kann die Anwesenheit eines, die zeitliche und mengenmäßige Wirkstoff-Freisetzung steuerenden Bestand-
15 teils wie etwa Collagen, vorgesehen werden. Weiterhin kann die Wirkstoff-Freisetzung durch die Art und das Ausmaß der Fibrinvernetzung beeinflusst werden. Für diesen Anwendungszweck besteht das Trägermaterial vorzugsweise aus etwa 65 bis 95 Gew.-% Fibrin und etwa 5 bis 35 Gew.-% Fibrinogen
20 und enthält zusätzlich wenigstens einen, den Heilungsprozeß fördernden Wirkstoff. Besonders gute Ergebnisse wurden mit einem solchen Trägermaterial aus etwa 70 bis 85 Gew.-% Fibrin und etwa 15 bis 30 Gew.-% Fibrinogen erzielt. Den oder die Wirkstoff(e) kann man bereits in die zur Trockenpräparat-
25 Herstellung verwendete Lösung einarbeiten und gemeinsam mit dieser lyophilisieren oder nachträglich in das lyophilisierte Trockenpräparat einarbeiten.

Ein spezielles Anwendungsgebiet eines solchen Wirkstoffhaltigen Fibrin/Fibrinogen-Vlieses ist die Behandlung von
30 Knochenmark-Entzündungen, weil das Trägermaterial voll resorbierbar ist und deshalb eine Nachoperation zur Entfernung des Depotmaterials nicht länger erforderlich ist. In diesem Fall ist das Trockenpräparat zweckmäßigerweise in Form von
35 Tabletten, Kugeln, oder sonstiger geeigneter Form konfektioniert und enthält neben Antibiotika Beimischungen von Calcium, Protease-Inhibitoren und Faktor XIII in beliebiger Kombination oder zweckmäßigen Mischungsverhältnissen, um

1 die Resorptionszeit und proteolytische Abbaubarkeit zu de-
terminieren. Ferner kann ein Zusatz von Wachstumsfaktoren,
wie z.B. Hormone und Plättchenextrakte in therapeutisch
erwünschter Menge und Verteilung vorgesehen werden.

5

In Verbindung mit Knochenfrakturen kann es zweckmäßig sein,
mit dem Wirkstoff-haltigen Trockenpräparat gezielt auch die
Knochenneubildung fördernde Zusätze anzubieten. Hierzu ge-
hören etwa natürliches, feinteiliges Knochenmaterial, wie
10 etwa denaturiertes Knochenmehl oder lyophilisierte und
pulverisierte Knochenpartikel oder synthetischer, knochen-
bildender Ersatzstoff, wie etwa anorganische Salze des
Kaliums, Magnesiums und Calciums, insbesondere Calciumphos-
phat, und hier besonders bevorzugt Tricalciumphosphat.
15 Ferner können die Kallusbildung anregende Wirkstoffe wie
etwa Thrombocyten-Wachstumsfaktoren oder Hormone vorgesehen
werden. Für diesen speziellen Anwendungszweck besteht das
Trockenpräparat vor allem aus etwa 30 bis 45 Gew.-% Fibrin,
aus etwa 4 bis 15 Gew.-% Fibrinogen, Rest natürliches fein-
20 teiliges Knochenmaterial und/oder synthetischer, knochen-
bildender Ersatzstoff sowie wenigstens ein antibakteriel-
ler Wirkstoff. Bei Bedarf kann dieses Trockenpräparat zusam-
men mit sterilisierten, lyophilisierten, homologen Knochen-
stücken und/oder mit autologer Spongiosa in die jeweilige
25 Knochenhöhle eingebracht werden. Dank seiner voluminösen
und biegsamen Struktur lassen sich auf diese Weise mit dem
erfindungsgemäßen Trockenpräparat Knochenhöhlen beliebiger
Abmessungen gut ausfüllen und abdichten. Das sich neu bil-
dende Knochengewebe kann dann mit der allmählichen Resorp-
30 tion des Fibrinnetzwerkes in dieses einsprossen, wobei die
gesteuerte Wirkstoff-Freisetzung über einen langen Zeitraum
hinweg ein antiseptisches Milieu gewährleistet.

35 Mit der vorliegenden Erfindung wird somit ein Trägersystem
aus einem Fibrin-Gemisch-Schaum zur Aufnahme biochemischer
Stoffe und Substrate zur akzelerierten Haemostase und opti-
mierten biochemischen Regelung des Wundverschlusses bereit-
gestellt. Als Grundsubstanz des Trägersystems dient ein

- 1 Schaum, bestehend aus einem Gemisch von Fibrin und anderen
Substanzen. Je nach den jeweils gewünschten Applikations-
zwecken wird dem Fibrin-Gemisch-Schaum einzeln oder in be-
liebiger Kombination und zweckmäßigen Mischungsverhältnis-
5 sen Fibrin, Thrombin, Prothrombin, Blutplättchenextrakte,
Protease-Inhibitoren etc. zugesetzt. Durch die Beimischung
von Proteinen wie etwa Albumin, Lipoprotein, Fibrin,
Fibronektin und Globulin kann die gewünschte Flexibilität
und Stabilität des Schaumes eingestellt werden. Als Bei-
10 mischung zu dem Fibrin-Gemisch-Schaum können - je nach
Applikationszweck - einzeln, in beliebiger Kombination
oder in zweckmäßigen Mischungsverhältnissen, insbesondere
Fibrin, Thrombin, Prothrombin, Blutplättchenextrakt,
Protease-Inhibitoren, Antibiotika etc. zugesetzt werden.
15 Ferner kann als Beimischung zu dem Fibrin-Gemisch-Schaum
ein Substrat oder Substrat-Komplex zur akzelerierten
Haemostase und optimierten chemischen Regelung des Wundver-
schlusses zugesetzt werden.
- 20 Die nachstehenden Beispiele dienen zur weiteren Erläuterung
der Erfindung, ohne diese einzuschränken.

Beispiel 1:

- 25 5 g Fibrinogen (mikrokristallines, durch Alkohol/Glycin-
Fällung aus Humanplasma erhaltenes Präparat wie oben ange-
geben) werden in 100 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung gelöst, so
daß eine Proteinendkonzentration von 50 mg/ml resultiert.
Der Fibrinogen-Lösung werden unter Rühren 300 Einheiten
30 Thrombin zugesetzt ("Topostasin" der Firma Hoffmann
LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen). Es wird noch kurzzeitig ge-
rührt und daraufhin der gesamte Ansatz in eine Lyophil-
sierungsform gegossen und für weitere 20 min bei Raumtempe-
ratur gehalten. Daraufhin wird tiefgefroren, nämlich der
gesamte Ansatz einschl. der Form innerhalb von 10 min auf
35 etwa -40°C abgekühlt. Der gebildete Eisblock wird daraufhin
lyophilisiert, wozu unter Vakuum die Dampfphase kontinuier-
lich abgepumpt und ausgefroren wird. Man erhält ein Gemisch
aus Fibrinogen und löslichem Fibrin in Form eines lockeren,

1 zusammenhängenden Proteinvlieses, das eine gute mechanische
Festigkeit und Reißfestigkeit aufweist. Neben katalytisch
wirksamen Mengen Thrombin besteht dieses Trockenpräparat
aus etwa 20 Gew.-% Fibrin und 80 Gew.-% Fibrinogen. An die-
5 sem Trockenpräparat wurden die nachstehenden Untersuchungen
durchgeführt:

Bestimmung des Fibringehaltes:

1,0 g des Trockenpräparates werden mit 10 ml 0,9 % NaCl-
10 Lösung aufgenommen, gerührt und von unlöslichen Anteilen
getrennt. Der Überstand wird in der Gelelektrophorese unter
Zusatz von Natrium-Laurylsulfat (ohne Mercaptoaethanol) in
Fibrinmonomere und Fibrinogen getrennt. Die Anteile werden
nach Anfärben mit Coomassie-Brilliant-Blue photometrisch ver-
15 messen und bestimmt. Es resultiert ein Fibringehalt von
etwa 20 % und ein Fibrinogengehalt von etwa 80 %.

Bestimmung der Fibrinogenaktivität:

1 ml der nach vorstehendem beschriebenen Verfahren erhalte-
20 nen Fibrinogen-Lösung wird mit 3 Einheiten Thrombin ver-
setzt, das sich bildende Fibrin um einen Stab gedreht, und
die verbleibende Lösung abgetrennt. Im Photometer lassen
sich die Extinktionen vor und nach der Fibrinabtrennung be-
stimmen. Aus dem ermittelten Wert wurde der Anteil an ge-
25 rinnbarem Fibrinogen zu mehr als 85 % des vorhandenen
Fibrinogens errechnet.

Bestimmung der Thrombinaktivität:

1 g des Trockenpräparates werden in 10 ml 0,9 %iger NaCl-
30 Lösung aufgenommen und bei 37°C inkubiert. Die Zeit bis zum
Eintritt der Gerinnung wird gemessen. Eine Vergleichslösung
mit reinem Fibrinogen und steigenden Zusätzen an Thrombin
dient als Bezugsgröße zur Bestimmung der Thrombinaktivität
im Lyophilisat. Im vorliegenden Fall konnte etwa 35 bis 45
35 Einheiten Thrombin nachgewiesen werden.

- 1 Zur Anwendung als Wundversorgungsmaterial wird das Fibrinogen/Fibrinvlies auf Abmessungen von 8 x 50 x 100 mm zurechtgeschnitten und sterilisiert. Bei Bedarf wird das Produkt auf die Wundfläche aufgelegt. Durch das Aufsaugen des Wundsekrets wird die Gerinnung des austretenden Blutes in Gang gesetzt.

Beispiel 2:

- 10 9 g Fibrinogen werden in 100 ml dest. Wasser aufgenommen und mit 300 Einheiten Thrombin versetzt. Nach dem Eingießen der Lösung in die Lyophilisierungsform wird der Fortgang der Reaktion beobachtet und bei einem merklichen Viskositätsanstieg nach ungefähr 20 min das Material sofort tiefgefroren.
- 15 Durch den höheren Thrombinzusatz wird der Anteil an löslichem Fibrin auf 40 bis 50 % gesteigert.

Beispiel 3:

- 20 9 g Fibrinogen werden mit 100 ml 0,1 %-iger Collagenlösung aufgenommen und mit 1 Million Einheiten Gentamycin versetzt. Zusätzlich enthält der Ansatz noch 100 000 Einheiten Trasylol. Das so vorbereitete Gemisch wird unter Rühren mit 3000 Einheiten Thrombin versetzt und in eine Lyophilisierungsform gegossen. Nach einer Reaktionszeit von 6 Std.
- 25 wird der Inhalt der Form tiefgefroren und lyophilisiert.

Beispiel 4:

- 30 5 g Fibrinogen werden in 100 ml einer 1 %-igen Albuminlösung aufgelöst und mit 3 Millionen Einheiten Gentamycin, 500 000 Einheiten Trasylol und 3000 Einheiten Thrombin versetzt. Nach Ausgießen in die Lyophilisierungsform werden 20 min später 2 ml Glutaraldehyd als Vernetzungshilfe zugegeben
- 35 und der Ansatz lyophilisiert.

1 Beispiel 5:

9 g Fibrinogen werden in 100 ml einer 5 %-igen Albuminlösung
aufgerommen. Dem Ansatz wird ein Anteil von 5 Millionen Ein-
heiten Baycillin und 1 Million Einheiten Aprotinin zugesetzt.
Nach Zugabe von 3000 Einheiten Thrombin wird das Material
in eine inerte Form gegossen und nach dem Gelieren tiefge-
froren. Der Anteil an Fibrin kann dadurch auf 85 % angehoben
werden. Das lyophilisierte Material gibt ein Proteinvlies
mit kompakter Struktur, das in Würfel geschnitten gut zur
Versorgung infizierter Knochenmarkshöhlen eingesetzt werden
kann.

Beispiel 6:

15

5 g Fibrinogen werden in 100 ml, 0,9 %-iger NaCl-Lösung,
die 0,025 M CaCl_2 enthält, gelöst. Dem Ansatz werden 1,0 g
Albumin und 500 Einheiten Faktor XIII zugesetzt. Als Anti-
biotikum soll das Material 1 Million Einheiten Baycillin
enthalten, die der Lösung als Pulver beigegeben werden.
100 000 Einheiten Aprotinin dienen zur Verhinderung einer
vorzeitigen Lyse des Wundversorgungsmaterials im Wundge-
biet. Der Inhibitor wird ebenfalls als Pulver der Lösung
zugesetzt. Durch die Zugabe von 30 000 Einheiten Thrombin
läßt man die Bildung des Fibrins in Gang kommen, dabei be-
findet sich der Ansatz bereits in der Trockenform. Nach
einer Reaktionszeit von 1 h wird das Material gefrierge-
trocknet. Der Zusatz von Faktor XIII erhöht den Vernetzungs-
grad des Fibrins und fördert die Stabilität des Vlieses.

30

Beispiel 7:

Zu 100 ml Plasma werden 5 g Fibrinogen gegeben und unter
Rühren gelöst. Nach Zusatz von 300 Einheiten Thrombin wird
die nach 20 Minuten gelierende Masse in eine Gefriertrock-
nungsform gegeben, tiefgefroren und anschließend lyophili-
siert.

35

1 Beispiel 8:

5 g Fibrinogen werden in 100 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung gelöst und mit 3000 Einheiten Thrombin versetzt. Nach 12 Stunden wird das Fibrin durch Rühren aus der Gelform in die Faserform überführt. Das fasrige Material wird in 5 %-iger Albuminlösung suspendiert und mechanisch zerkleinert. Nach Zusatz von 2 ml Glutaraldehyd wird der Ansatz tiefgefroren und anschließend lyophilisiert.

10

15

20

25

30

35

1 Patentansprüche:

1. Fibrinogen-haltiges Trockenpräparat
5 mit einer durch Gefriertrocknung erzielten Schaum-
bzw. Vliesstruktur,
insbesondere als Wundversorgungsmaterial, Füllmaterial
für Knochenhöhlräume und/oder Trägermaterial für wei-
tere Wirkstoffe,
10 dadurch gekennzeichnet, daß
das Vlies neben Thrombin in zumindest katalytisch
wirksamen Mengen im wesentlichen aus etwa
10 bis 95 Gew.-% Fibrin und etwa
5 bis 90 Gew.-% Fibrinogen
15 besteht.
2. Trockenpräparat nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
20 1 cm³ Vliesmaterial etwa 0,1 bis 10 Einheiten (NIH-
Einheiten) Thrombin enthält.
3. Trockenpräparat nach Anspruch 1,
25 dadurch gekennzeichnet, daß
das vor allem als blutstillendes und wundheilendes
Wundversorgungsmaterial vorgesehene Vlies einen
Thrombingehalt von wenigstens 1 Einheit Thrombin pro
1 cm³ Vliesmaterial aufweist und
30 etwa 10 bis 40 Gew.-% Fibrin,
etwa 60 bis 90 Gew.-% Fibrinogen, und
0 bis 1,2 Gew.-% gerinnungsfördernde Substanzen,
gefäßaktive Stoffe und Ge-
35 rinnungsfaktoren enthält.

- 1 4. Trockenpräparat nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß
das vor allem als blutstillendes und wundheilendes
Wundversorgungsmaterial vorgesehene Vlies im wesentli-
5 chen aus 10 bis 40 Gew.-% Fibrin und 60 bis 90 Gew.-%
Fibrinogen besteht, und in dieses Vlies nachträglich
ein pulverförmiges angereichertes Plasmaderivat, näm-
lich eine Wirkstoffkombination zur akzelerierten
Haemostase und optimierten biochemischen Regelung des
10 Wundverschlusses eingearbeitet worden ist.
5. Trockenpräparat nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß
15 das vor allem als Trägermaterial vorgesehene Vlies aus
etwa 65 bis 95 Gew.-% Fibrin sowie
etwa 5 bis 35 Gew.-% Fibrinogen besteht und zusätzlich
wenigstens einen, den Heilungsprozeß fördernden Wirk-
stoff wie etwa ein Antibiotikum oder dgl. enthält.
20
6. Trockenpräparat nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß
das vor allem als Füllmaterial für pathologische
25 Knochenhöhlräume vorgesehene Vlies besteht aus
etwa 30 bis 45 Gew.-% Fibrin,
etwa 4 bis 15 Gew.-% Fibrinogen,
Rest natürliches feinteiliges Knochenmaterial und/oder
synthetischer, knochenbildender Ersatzstoff sowie
30 wenigstens ein antibakterieller Wirkstoff.
7. Trockenpräparat nach Anspruch 5 oder 6,
dadurch gekennzeichnet, daß
35 das Vlies zusätzlich einen, die zeitliche und mengen-
mäßige Wirkstoff-Freisetzung steuernden Bestandteil
enthält

- 1 8. Trockenpräparat nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet, daß
das Fibrin im wesentlichen nur über die γ -Ketten der
Fibrinmonomere verknüpft ist.
5
9. Trockenpräparate nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet, daß
das Vlies zusätzlich ein oder mehrere Glykoproteine,
10 nämlich Albumin, Lipoprotein, Fibronektin oder Globulin
enthält.
10. Trockenpräparat nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
15 dadurch gekennzeichnet, daß
das Vlies zusätzlich einen oder mehrere Fibrinolyse-
Inhibitor(en) enthält.
11. Verfahren zur Herstellung eines Trockenpräparates nach
20 einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet, daß
in einer Fibrinogen und Thrombin enthaltenden wässrigen
Lösung in situ Fibrin erzeugt wird, und
das entstehende Reaktionsgemisch tiefgefroren und
25 llyophilisiert wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11
dadurch gekennzeichnet, daß man
30 a) Wasser, Humanserum oder eine wässrige Salzlösung mit
Fibrinogen versetzt;
b) der Fibrinogen-haltigen Lösung gegebenenfalls einen
oder mehrere Wirkstoffe, Zusätze und dergleichen
hinzufügt;
35 c) die erhaltene Lösung mit Thrombin oder einer Thrombin-
bildenden Vorstufe versetzt;

- 1 d) das Gemisch unter üblichen Bedingungen reagieren
läßt, bis sich ein Teil, jedoch nicht die Gesamt-
menge Fibrinogen zu Fibrinmonomeren umgesetzt hat;
e) nach ausreichender Umsetzung tieffriert; und
5 f) schließlich lyophilisiert.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12,
dadurch gekennzeichnet, daß
man der Ausgangslösung pro 1 ml Lösung 10 bis 90 mg
10 Fibrinogen und 0,1 bis 10 Einheiten Thrombin zusetzt
nach der Thrombinzugabe bei Raumtemperatur 10 bis 40
min lang rührt;
das Reaktionsgemisch auf eine Temperatur unterhalb
-200 C abkühlt; und
15 das gebildete Eis lyophilisiert, ohne daß sich erneut
eine flüssige Phase bildet.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13,
20 dadurch gekennzeichnet, daß
die Fibrinbildung in Gegenwart von SH-Gruppen blockie-
renden Substanzen durchgeführt und/oder das Fibringe-
misch durch Zusatz von Vernetzungsmittel vernetzt wird.
- 25
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14,
dadurch gekennzeichnet, daß
man das aus der Gefrierform entnommene Trockenpräparat
zurechtschneidet, feuchtigkeitsdicht verpackt, und die
30 Verpackung samt Inhalt sterilisiert.
16. Verwendung des Trockenpräparates nach einem der An-
sprüche 1 bis 10,
35 zur akzelerierten Haemostase und optimierten bioche-
mischen Regelung des Wundverschlusses, wozu man auf
dem Fibrin/Fibrinogen-Vlies eine pulverförmige Wirk-
stoffkombination, enthaltend Fibrinogen, Thrombin,

- 1 Komponenten des Prothrombinkomplexes, Proteaseinhibi-
toren, Blutplättchenextrakt und/oder Antibiotika auf-
trägt.
- 5
17. Verwendung des Trockenpräparates nach einem der An-
sprüche 1 bis 10,
zur Behandlung von Knochenmarksentzündungen,
wozu man das Fibrin/Fibrinogen-Vlies mit den zur
10 Therapie erforderlichen Wirkstoffen wie etwa Antibio-
tika und dgl. versieht und in den pathologischen
Knochenhohlraum einbringt.
- 15 18. Verwendung nach Anspruch 17,
wobei das Vlies teilchenförmig ausgebildet ist, etwa
in der Gestalt von Kugeln oder Tabletten.

20

25

30

35

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.